



LE LAIT

REVUE GÉNÉRALE DES QUESTIONS LAITIÈRES

SOMMAIRE

MÉMOIRES ORIGINAUX :

- C. ALAIS, B. RIBADEAU-DUMAS, L. SAINT-LEBE. — Etude de la réaction des protéines du lait avec le « Noir amido ». Application au dosage rapide des matières azotées du lait . . . 241
- G. MICHON. — Comment concevoir une surveillance des pollutions radioactives du lait . . . 273
- G. THIEULIN. — Le lait : formules nouvelles . . . 280

REVUE :

- G. GÉNIN. — L'industrie laitière dans le monde . . 284

BIBLIOGRAPHIE ANALYTIQUE :

- 1° Les livres 291
- 2° Journaux, Revues, Sociétés savantes 303
- 3° Brevets 339

BULLETIN BIBLIOGRAPHIQUE :

- 1° Les livres 345
- 2° Journaux, Revues, Sociétés savantes 346
- 3° Brevets 352

DOCUMENTS ET INFORMATIONS :

- Y. GANDON. — La situation laitière 356
- Le rôle du lait dans certaines pratiques religieuses . . . 360
- Augmentation de la consommation du beurre en Angleterre 363
- Production laitière de la Belgique en 1959 363
- Production laitière dans la C.E.E. 364
- Journées d'Etudes de la F.I.L. 366
- Annuaire Industrie laitière . 367
- Annuaire du Froid 368
- Salon équipement laitier . . 368

MÉMOIRES ORIGINAUX (1)

ETUDE DE LA RÉACTION DES PROTÉINES DU LAIT AVEC LE « NOIR AMIDO ». APPLICATION AU DOSAGE RAPIDE DES MATIÈRES AZOTÉES DU LAIT.

par

C. ALAIS, B. RIBADEAU DUMAS, L. SAINT-LEBE

Station Centrale de Microbiologie et Recherches Laitières
C.N.R.Z., Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)

INTRODUCTION

La méthode colorimétrique au noir amido, proposée par SCHÖBER et HETZEL [1], paraît bien convenir au dosage rapide des matières azotées du lait. Elle a été particulièrement développée en Norvège, pour le dosage de petites séries d'échantillons (STEIN-

(1) Reproduction interdite sans indication de source.

SHOLT [2], [3], HADLAND et JOHNSEN [4]) et en Hollande, pour le dosage de grandes séries d'échantillons (RAADSVELD [5], [6], [7] POSTHUMUS [8]). Aux Etats-Unis, une autre réaction colorée utilisant l'orangé G a été proposée par UDY [9].

Une méthode rapide de dosage des matières azotées du lait, suffisamment précise et fidèle, est intéressante à plusieurs points de vue :

— sélection d'un bétail laitier produisant un lait riche en protéines ;

— paiement du lait aux producteurs selon la teneur en matières azotées, principalement dans les régions fromagères ;

— expérimentation sur le bétail laitier (influence de l'alimentation, etc.) ;

— mesure du rendement en fromage du lait dans les laiteries, le fromage étant essentiellement constitué par la plus grande partie de la matière grasse et de la matière azotée du lait.

Les résultats les plus étendus, pour l'application pratique de la méthode au noir amido, ont été acquis dans des contrées où le cheptel et les conditions d'élevage sont relativement homogènes et uniquement pour le lait de vache.

En France, une pareille homogénéité n'existe pas : plusieurs races sont élevées pour la production du lait et les conditions d'élevage varient d'une région à l'autre ; on peut donc s'attendre à ce que l'amplitude des variations du taux des matières azotées soit assez grande. D'autre part, les laits de brebis et de chèvres sont commercialisés sur une échelle assez importante et transformés, pour la plus grande part, en fromage ; on peut donc envisager de leur appliquer une sélection ou un paiement différentiel selon leur richesse en matières azotées.

Sur un autre plan, il semble utile de considérer l'application du dosage des matières azotées à d'autres produits que le lait cru, tels que les laits chauffés (pasteurisés, stérilisés) et les sérums de fromagerie. Enfin, on doit considérer le cas des laits de mammite qui forment souvent une proportion non négligeable du lait produit. On sait que, dans ces laits, la distribution des fractions azotées est différente de celle d'un lait normal.

Il nous a donc paru nécessaire, avant de préconiser la méthode colorimétrique, de faire des études complémentaires et de rechercher, en particulier, l'influence que pourraient avoir sur le résultat obtenu, des différences dans la répartition des composants azotés

du lait : caséine, protéines solubles, substances azotées non protéiques (N.P.N.) *

On sait, depuis les travaux de FRAENKEL-CONRAT [10] que la capacité de fixation d'un colorant ionique varie pour diverses protéines. Dans le cas du lait, ces différences ont été mises en évidence par ASHWORTH et SEALS [11], avec l'orangé G ; elles sont importantes.

I. — Le dosage des matières azotées du lait par le noir amido

Principe

On fait réagir, avec les protéines du lait, un excès de solution du colorant dans un tampon phosphate citrate à pH 2,45. A cette valeur de pH , inférieure au point isoélectrique, les protéines sont chargées positivement (groupements basiques de l'histidine, de l'arginine et de la lysine) et elles se combinent avec les molécules du colorant chargées négativement ; il en résulte la coloration et la précipitation de ces protéines. On détermine l'excès du colorant en mesurant la densité optique du surnageant. Plus la quantité de protéines est grande, plus la densité optique est faible et inversement.

L'application de la méthode à un nombre suffisant d'échantillons de lait et le dosage simultané de l'azote total par la méthode Kjeldahl permet de tracer une courbe de régression qui est une droite à l'intérieur de certaines limites.

Technique

Nous avons appliqué la technique décrite par STEINSHOLT [3] : 0,75 g de lait de vache (10 ml d'une solution à 7,5 p. 100 p/v) réagissent avec 20 ml de la solution millimolaire de colorant : 0,6165 g noir amido dans 1 l de tampon phosphate-citrate de pH 2,45 (3,983 g phosphate disodique cristallisé à 12 H_2O + 16,01 g d'acide citrique ; compléter à 1 l avec l'eau distillée). Après contact de

* Pour la clarté de l'exposé, nous rappellerons ici le sens donné aux différents termes utilisés pour désigner les composants azotés du lait :

- la caséine est la fraction précipitée à froid à pH 4,6, par addition d'acide ;
- le phosphocasinat est le sédiment séparé par ultra-centrifugation du lait ;
- les protéines solubles représentent les albumines, globulines, et protéoses-peptones (équivalent du terme « Non-casein proteins » d'*Aschaffenburg* [12] ;
- les protéines totales représentent la caséine plus les protéines solubles ;
- les matières azotées totales ($N \times 6,38$), représentent l'ensemble des matières azotées, y compris les matières azotées non-protéiques (N.P.N.).

10 mn, on sépare le précipité, soit par centrifugation, soit par filtration. On mesure au spectrophotomètre Beckman B, à 612,5 m μ , dans les tubes standard de 1,25 cm de diamètre, l'absorption de la dilution à 5/200 du filtrat ou du surnageant.

Nous avons utilisé la même technique pour d'autres produits que le lait de vache (laits de brebis et de chèvre, solution de caséinate, etc...) en prenant chaque fois des quantités équivalentes de protéines, de façon que les lectures au spectrophotomètre restent comprises entre 0,2 et 0,5 densité optique, c'est-à-dire dans la zone où la densité optique est inversement proportionnelle à la teneur en matières azotées mesurée par la méthode de Kjeldahl et où la précision des lectures est la meilleure.

II. — Etude de certains facteurs qui influent sur le résultat du dosage

Filtration

La plupart des techniques indiquent que l'on sépare le précipité de protéines colorées par centrifugation. Nous avons essayé la filtration en considérant que cette technique pouvait être utile dans les petits laboratoires de laiterie. Les précautions suivantes ont été prises : dimensions fixes des entonnoirs et du papier ; papier non plissé à vitesse de filtration moyenne ; le filtre est rempli d'un seul coup et on attend que tout le liquide soit écoulé avant de faire le prélèvement.

Nous avons remarqué que, par filtration, on obtient des valeurs de densité optique légèrement inférieures à celles que donne la centrifugation. La figure 1 illustre l'expérience suivante : des dilutions progressives du colorant sont mesurées au photomètre, avec et sans filtration. La courbe correspondant aux solutions filtrées est une courbe brisée : à l'origine elle se détache de la droite correspondant aux solutions non filtrées et devient ensuite approximativement parallèle à cette même droite. Ceci montre que le papier adsorbe une petite quantité de matière colorante.

D'autre part, le papier filtre n'a pas une épaisseur parfaitement régulière et la densité optique du même liquide passé à travers des papiers de poids différents varie, en première approximation, de façon inversement proportionnelle au poids du filtre : 400 mg, d. o. 0,430 ; 420 mg, d. o. 0,425 ; 490 mg, d. o. 0,415 ; 525 mg, d. o. 0,420.

Cependant les résultats de grandes séries d'essais en double (filtration-centrifugation) montrent que la précision des deux tech-

niques est sensiblement la même, confirmant le résultat obtenu par ASHWORTH et SEALS [11], SHIGA et al. [16].

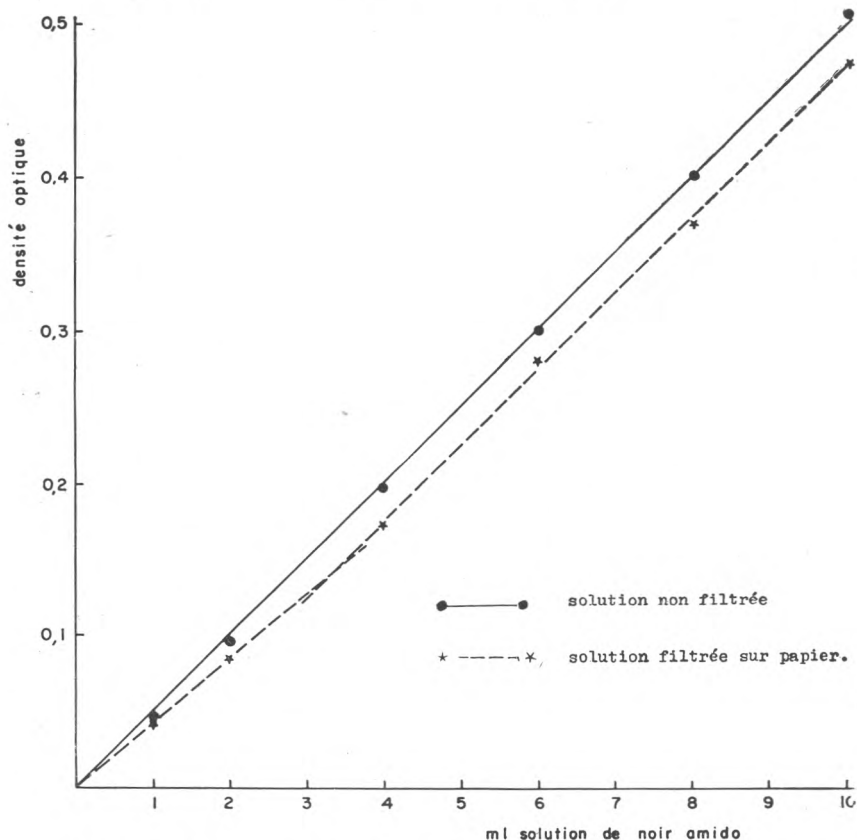


FIG. 1. — Influence de la filtration de la solution du noir amido sur la densité optique.

Pureté du colorant

Nous avons constaté de petites différences dans l'absorption des solutions préparées avec différents lots de noir amido 10B Merck pour électrophorèse (n° 1167) et des différences beaucoup plus grandes avec des lots d'autres provenances comme le montre le tableau I. D'autre part le produit n'est pas parfaitement soluble.

Deux microanalyses organiques élémentaires ont été faites * sur le contenu de deux flacons de noir amido 10 B Merck pour

* Ces analyses ont été effectuées par le Service Central de Microanalyse du C.N.R.S., Paris; nous remercions très vivement le Dr Lévy qui a bien voulu se charger de ces déterminations.

TABLEAU I
VARIATIONS DE LA DENSITÉ OPTIQUE DE DIVERS LOTS
DU NOIR AMIDO-COLORANT

Provenance	Densité optique (1)
Bayer 1 ^{er} lot	0,430
Bayer 2 ^e lot	0,390
Bayer 3 ^e lot	0,370
Merck 1 ^{er} lot	0,440
Merck 2 ^e lot	0,435
Chroma	0,285
Anonyme	0,230

(1) Dilution à 0,7 p. 100 de la solution utilisée pour le dosage des protéines.

électrophorèse (n° 1167). Le tableau II montre que le produit non déshydraté contient environ 85 p. 100 de $C_{22}H_{14}O_9N_6S_2Na_2$ et le produit déshydraté 92 p. 100.

TABLEAU II
COMPOSITION DU COLORANT « NOIR AMIDO »

	$C_{22}H_{14}O_9$ $N_6S_2Na_2$	Analyse du noir amido (2)		P. 100 de la composition théorique	
		N° 1	N° 2	Moyenne des 2 échantillons	
				bruts	déshydratés
C	42,82	36,32 (1)	37,03 (1)	85,6	92,0
H	2,27	3,43 (1)	3,20 (1)	146,0	112,4
O	23,36	—	—	—	—
N	13,62	10,99 (1)	11,50 (1)	82,5	88,5
S	10,38	8,97 (1)	8,87 (1)	86,0	92,5
Na	7,46	5,96 (1)	—	80,2	86,2
H ₂ O	0	7,8	6,0		
C/N	3,14	3,03	3,22		

(1) Résultat de la micro-analyse (*D^r Lévy*).

(2) noir amido 10 B Merck pour électrophorèse, n° 1167 (deux échantillons : n° 1 et n° 2).

La teneur en humidité a été déterminée en plaçant le produit dans un dessiccateur à anhydride phosphorique, sous vide à la température ordinaire ; on observe une perte de poids de 6 à 8 p. 100.

Notre résultat concernant la pureté du colorant noir amido 10 B

Merck pour électrophorèse est donc notablement inférieur à la valeur indiquée par HADLAND et JOHNSEN [4], soit 95-97 p. 100.

Il y aurait intérêt à disposer d'un colorant pur, ou tout au moins d'une pureté définie et constante.

Les poids indiqués dans la suite du texte sont, sauf indication contraire, des poids de colorant brut.

III. — Méthodes d'étude et mode de calcul des résultats

Les teneurs du lait en différents constituants azotés ont été déterminées selon Aschaffenburg et Drewry [12].

En ce qui concerne le noir amido on a déterminé, par la méthode de dosage habituelle décrite ci-dessus, deux valeurs caractéristiques :

1) la proportion des substances azotées réagissant avec le colorant qui est donnée par la formule :

$$(1) p = \frac{Nt - (Nf - Nc)}{Nt} \times 100$$

dans laquelle :

Nt = azote total de la prise d'essai

Nf = azote du surnageant ou du filtrat correspondant

Nc = azote du colorant en excès dans le surnageant ou dans le filtrat.

2) la quantité (a) de colorant fixée, en mg par g de protéine réagissant avec le colorant, qui est donnée par la formule :

$$(2) a = \frac{12,33 - kd}{Nt - (Nf - Nc) \times 6,38}$$

dans laquelle :

12,33 = quantité de colorant, en mg, dans le volume de réactif employé

d = densité optique du surnageant

k = facteur de conversion de d en mg de colorant.

Toutes les teneurs en azote sont déterminées par micro-Kjeldahl ; Nt et Nf sont déterminés à chaque expérience ; Nc est obtenu en utilisant la droite, établie une fois pour toutes, qui relie la densité optique à la teneur en azote du colorant en solution dans le tampon.

« k » est le coefficient angulaire d'une droite semblable à la précédente, reliant la densité optique à la quantité de colorant en solution, mais ici la valeur de k dépend des conditions d'expérience comme nous le verrons plus loin (page 250 et tableau III).

Ces calculs font intervenir l'azote du colorant en excès, dont la détermination par micro-Kjeldahl est délicate : la digestion sulfurique doit être conduite dans des conditions bien régulières, car l'azote du noir amido n'est que partiellement transformé en ammoniacque et le résultat varie légèrement avec la durée de la digestion ; par réduction préalable (avec l'hydrosulfite de sodium, l'hyposulfite de sodium ou l'acide iodhydrique) on ne peut atteindre la valeur donnée par la micro-analyse élémentaire du colorant.

Pour obvier à cet inconvénient, nous avons vérifié les résultats obtenus par une autre méthode : à des quantités fixes de lait, de caséinate ou de protéines solubles, on ajoute des quantités croissantes de la solution de noir amido. Le mode opératoire restant le même que dans la méthode habituelle, on mesure chaque fois la densité optique du surnageant ainsi obtenu. Le but de cette opération est de permettre le tracé d'une courbe des densités optiques en fonction de la quantité de colorant, courbe passant par un *point d'équivalence*, pour lequel la quantité de colorant doit être juste suffisante pour assurer la précipitation complète des protéines présentes. A ce point le surnageant, incolore, ne contient que les substances azotées du lait qui n'ont pas réagi avec le colorant ; le terme N_c (dans les équations (1) et (2) ci-dessus) disparaît alors des calculs.

IV. — Détermination de la quantité de noir amido fixée par les protéines du lait de vache, d'après le point d'équivalence

On a déterminé la capacité de fixation du colorant que possèdent les produits suivants :

1. *Le lait* (lait de mélange) frais et écrémé ;
2. *La caséine* isoélectrique, purifiée par quatre précipitations successives, mise en solution sodique à pH 6,8 ;
3. *Le filtrat* à pH 4,6 du lait, contenant les protéines solubles. Ce filtrat est obtenu selon la technique d'ASCHAFFENBURG et DREWRY [12]. Outre les substances solubles du lait diluées dans la proportion de 1 à 2,5, le filtrat contient 0,4 p. 100 d'acide acétique et 0,328 p. 100 d'acétate de sodium ($CH_3-COO Na$) ;
4. *La protéose-peptone* obtenue en suivant les indications des mêmes auteurs [12]. Le précipité de protéose-peptone est lavé avec une solution de sulfate de soude tamponné à pH 4,6 ; finalement il est dissous dans l'eau à pH 7 ;
5. *La β -lactoglobuline* * en solution dans $ClNa$ 0,5 M.

* Nous avons utilisé une préparation mise à notre disposition par le Laboratoire de Biologie Physicochimique de la Faculté des Sciences de Paris. Nous remercions tout spécialement *M^{lles} S. Guinand et J. Yon.*

Technique

A 10 ml de solution de protéine, contenant les quantités de matières azotées indiquées dans le tableau IV, on ajoute de 1 à 20 ml de la solution de noir amido et de 19 à 0 ml de tampon (sans colorant) pour maintenir le volume final à 30 ml. Le précipité est séparé par centrifugation, excepté pour l'essai de la protéose-peptone, dans lequel on a opéré par filtration. Dans le cas des protéines solubles et de la β -lactoglobuline — et pour la portion de courbe située avant le point d'équivalence — la séparation du précipité est difficile car celui-ci se remet facilement en suspension.

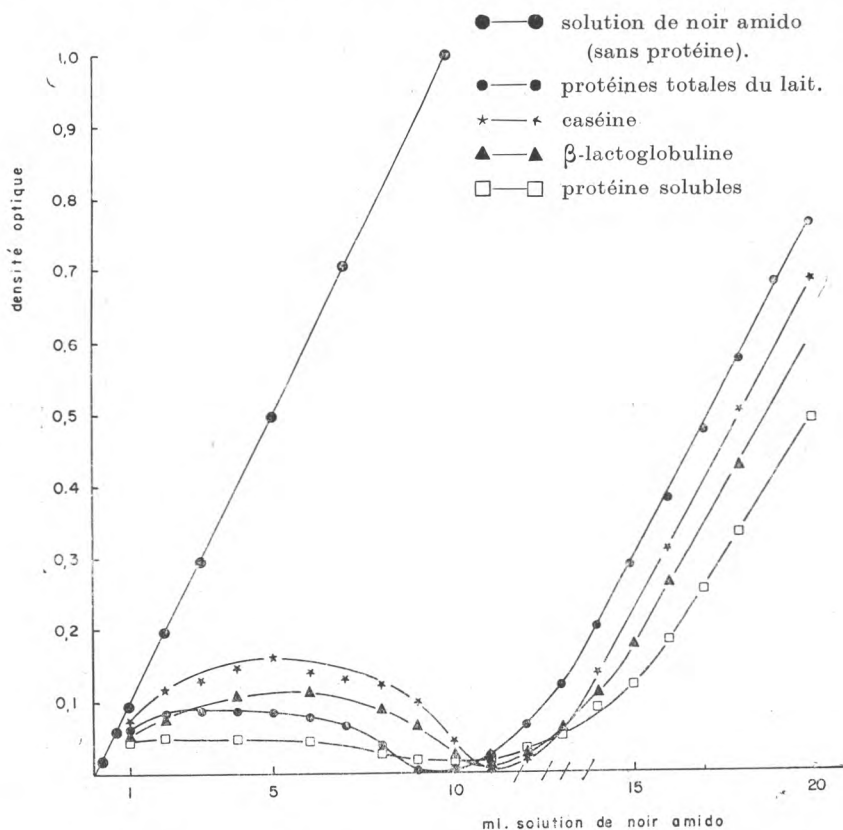


FIG. 2. — Densité optique du surnageant en fonction du volume de solution colorante ajoutée aux solutions des protéines du lait.

Résultats

Les courbes des densités optiques du surnageant en fonction des quantités de colorant ajoutées présentent trois particularités (fig. 2).

Avant le point d'équivalence, alors qu'il y a défaut de colorant par rapport aux protéines, le surnageant n'est pas incolore et la densité optique va d'abord en croissant ; elle atteint un maximum puis décroît. La valeur du maximum n'est pas en rapport avec la quantité de protéine présente, mais dépend de la nature de la protéine : les plus grandes valeurs sont obtenues avec la caséine et les plus petites avec les protéines solubles.

Le point d'équivalence n'est pas déterminé par l'intersection de deux segments de droite ; on obtient des courbes arrondies qui s'approchent tangentiellement de l'axe des abscisses. La partie droite qui satisfait à la loi de BEER-LAMBERT ne se présente qu'après l'addition d'une quantité de colorant nettement supérieure à celle du point d'équivalence.

TABLEAU III
VARIATIONS DU COEFFICIENT K

	Mode opératoire			
	Centrifugation		Filtration	
	$d(1)$	k	$d(1)$	k
Solution de noir amido	0,05	12,33	0,0475	13,00
Protéines totales du lait	0,048	12,88	0,0455	13,55
Caséine	0,0455	13,5	—	—
Protéines solubles	0,0395	15,59	0,0435	14,18
β -Lactoglobuline	0,043	14,35	—	—
Protéose-peptone	—	—	0,045	13,68

(1) d : densité optique du filtrat ou du surnageant dilué à 5 p. 200, correspondant à 1 ml de solution milli-molaire de noir amido (contenant 0,6165 g/l) ;

$$k : \frac{0,6165}{d}$$

De plus, la partie droite n'est jamais parallèle à celle que l'on obtient avec une solution pure de noir amido ; son coefficient angulaire (k , dans la formule (2) page 247), dépend de la nature, mais non de la quantité, des substances azotées précipitées (tableau III) ; il dépend aussi du mode opératoire (centrifugation ou filtration).

Les courbes de la figure 3 montrent que la quantité des matières azotées précipitées varie comme la quantité de colorant entraînée dans le précipité. Le point d'équivalence protéine/colorant est défini par le point de tangence de la courbe avec la droite correspondant à la solution pure de noir amido ; à ce point, le surnageant est incolore (la densité optique par rapport à l'eau est de 0,002 pour

une cuve de 1,25 cm) et la précipitation de la protéine apte à réagir avec le colorant est totale.

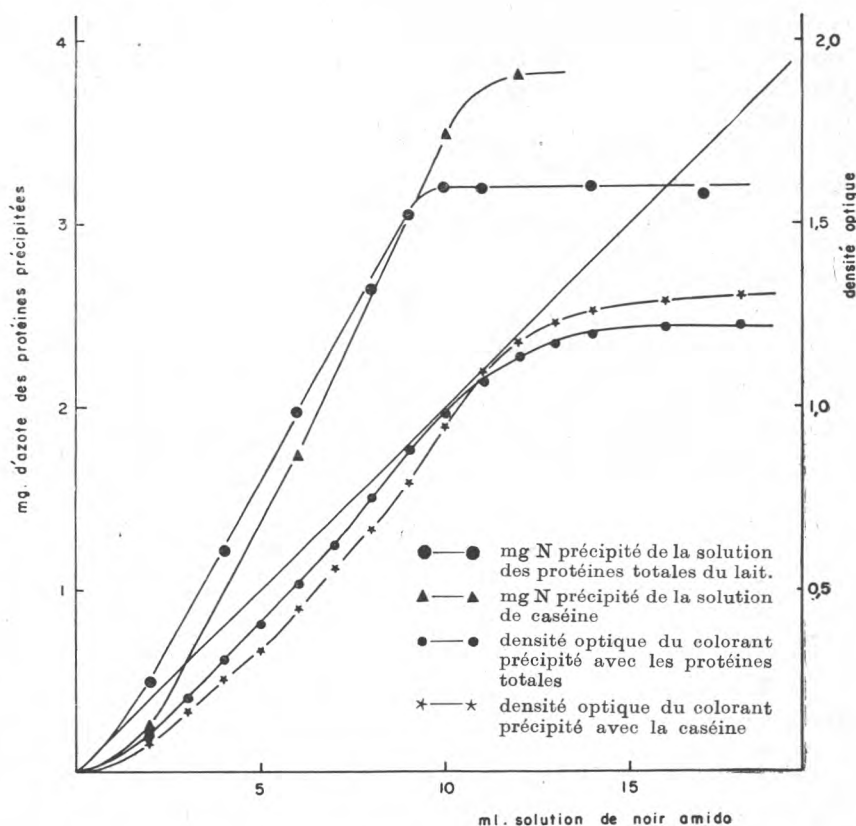


FIG. 3. — Protéines précipitées et quantités de noir amido fixées en fonction du volume de colorant.

Les densités optiques correspondent au colorant fixé par les protéines ; elles sont obtenues par différence entre la densité optique de la solution de noir amido additionnée d'eau (au lieu de lait ou de protéine) et les densités optiques de la même solution additionnée de lait ou de fractions protéiques.

La droite passant par l'origine représente la densité optique de la solution pure de noir amido en fonction de la concentration du colorant.

Après ce point, la quantité de protéine précipitée n'augmente plus, mais la quantité de colorant fixée par le précipité s'accroît encore. Ceci est dû, probablement, à une adsorption supplémentaire du colorant sur le précipité. Les courbes de la figure 2 déterminent en effet, deux points caractéristiques : un premier point est le point d'équivalence réelle correspondant à la densité optique zéro

(100 p. 100 de protéine précipitée) un deuxième point est le point situé à l'intersection de l'axe des abscisses avec le prolongement de la partie droite obtenu avec un excès notable de colorant. L'écart entre ces deux points donne une mesure de la quantité supplémentaire de colorant adsorbée sur le précipité. Il faut noter, cependant, que l'adsorption n'est peut-être par terminée lorsque la courbe devient une droite puisque — nous venons de le voir — celle-ci n'est pas parallèle à la droite obtenue avec la solution pure de noir amido dans les mêmes conditions.

Le deuxième point correspond aux conditions de la pratique du dosage : c'est celui que nous avons pris en considération dans les comparaisons qui suivent.

TABLEAU IV
EXPÉRIENCES D'ÉQUIVALENCE

	Matières azotées dans l'essai (mg)	Matières azotées non-précipitées par le colorant (1)	Colorant fixé (2)	Mode de séparation du précipité
Lait (3)	22,1	7,8	359	Centrifugation
Caséine	24,4	0	317	Centrifugation
Protéines solubles. Filtrat pH 4,6 ...	29,4	30,8	417	Centrifugation
Protéose-peptone ..	9,93	24,5	484	Filtration
β - Lactoglobuline ..	17,2	4	487	Centrifugation

(1) p. 100 des matières azotées totales contenues dans chacun des échantillons.

(2) mg de noir amido par g de protéines précipitées.

(3) Lait de mélange.

Le tableau IV montre que la quantité de noir amido fixé par gramme de protéine précipitée varie selon les substances étudiées ; c'est la caséine qui fixe le moins de colorant, puis viennent les protéines du sérum, la lactoglobuline et la protéose-peptone dont la capacité de fixation est la plus élevée. Toutefois, la valeur trouvée pour les protéines solubles du filtrat isoélectrique est sujette à caution : en effet, en se reportant à la figure 2, on voit que la courbe des protéines solubles présente, au voisinage de l'axe des abscisses, une longue partie incurvée qui est, peut-être, la conséquence d'un effet de sel.

La caséine réagit entièrement avec le colorant ; par contre, 4 p. 100 de la lactoglobuline et 25 p. 100 environ de la protéose-peptone ne précipitent pas avec le noir amido.

Dans le cas du lait et du filtrat à pH 4.6, la présence du NPN augmente la proportion des matières azotées non précipitées par le colorant.

Les courbes de la figure 2 montrent que, pour une densité optique faible, on ne peut savoir si l'on se trouve en présence d'un excès ou d'un défaut de colorant. Pour éliminer ce doute, il est nécessaire que l'excès de colorant soit tel que la densité optique du surnageant dépasse une valeur minimum et corresponde à un point situé sur la partie linéaire de la courbe.

V. — Détermination de la quantité de noir amido fixée par les protéines du lait de vache, en présence d'un excès de colorant

(Méthode de dosage décrite page 243)

A. — *Les protéines totales du lait.*

On utilise les formules données plus haut (page 247) pour calculer la quantité de colorant fixé et la proportion des protéines précipitées.

Le tableau V montre les résultats obtenus pour six laits de mélange. Ils ont été classés selon les proportions de caséine dans les matières azotées totales.

La capacité de fixation, exprimée en milligrammes de noir amido par gramme de protéine, présente une certaine marge de variation (il faut noter que tous les échantillons n'ont pas été prélevés à la même époque). La moyenne est de 377 et les valeurs extrêmes 359 à 390. On remarque que les valeurs maxima et minima de fixation du colorant correspondent aux valeurs maxima et minima du taux des protéines solubles.

La proportion de matières azotées non précipitées par le colorant est toujours supérieure à la proportion de N.P.N. Il est probable qu'une petite fraction des protéines solubles se comporte comme le N.P.N. (ASHWORTH et SEALS [11]) et ne réagit pas avec le colorant. Ce résultat concorde avec celui obtenu au cours des expériences précédentes avec la méthode d'équivalence.

B. — *Les protéines solubles dialysées.*

Le filtrat isoélectrique du lait, contenant les protéines solubles et la fraction N.P.N., est obtenu selon les indications d'ASCHAF-FENBURG et DREWRY [12]. La dialyse est réalisée dans un boyau de cellulose (Visking), contre l'eau distillée à 2° C. Dans deux expériences, on a dialysé parallèlement le lait dont provenait le filtrat. Dans une expérience, on a dialysé le filtrat après l'élimination de la protéose-peptone [12]. Le tableau VI montre les résultats obtenus

TABLEAU V

EXPÉRIENCES AVEC DIFFÉRENTS LAITS DE MÉLANGE DE VACHE

Laits	Matières azotées totales pour 100 g.	Densité optique	Caséine (1)	Protéines solubles (1)	N.P.N. (1)	Matières azotées non-précipitées par le colorant (1)	Protéines précipitées par le colorant (2)	Colorant fixé (3)
1	2,92	0,326	76,6	17,0	6,40	8,1	98,1	382
2	2,99	0,299	76,6	18,0	5,38	6,6	98,6	390
3	3,01	0,307	76,8	17,7	5,50	6,2	99,2	380
4	2,96	0,345	77,5	—	—	7,2	—	372
5	3,31	0,290	77,5	16,4	6,10	8,5	97,5	359
6	3,30	0,247	78,2	16,6	5,24	6,1	99,1	380
<i>Moyenne</i> ..			77,2	17,1	5,70	7,1	98,5	377

(1) p. 100 des matières azotées totales.

(2) p. 100 des protéines totales.

(3) mg de noir amido par g de protéines précipitées.

TABLEAU VI
EXPÉRIENCES DE DIALYSE

	Matières azotées totales pour 100 g.	Densité optique	N.P.N. (1)	Matières azotées dialysables (1)	Matières azotées non-précipitées par le colorant (1)	Colorant fixé (2)
— A —						
<i>Lait</i> (3) :						
non dialysé	2,88	—	—	5,8	—	—
<i>Filtrat</i> :						
non dialysé	0,700	0,169		6	5,71	450
dialysé	0,528	0,17	—	—	0,795	476
— B —						
<i>Lait</i> (3) :						
non dialysé	3,29	0,56	4,85	4,63	—	—
dialysé	3,14	0,57	—	—	—	—
<i>Filtrat</i> :						
non dialysé	0,727	0,488	4,85	4,88	—	478
dialysé	0,566	0,492	—	—	—	480
— C —						
<i>Lait</i> (3) :						
non dialysé	2,97	0,295	—	—	—	—
dialysé	—	0,298	—	—	—	—
<i>Filtrat</i> :						
non dialysé	0,714	0,514	—	6,2	—	451
dialysé	0,534	0,516	—	—	—	480
<i>Filtrat</i> : (moins la protéose-peptone : 1,31 p. 100 de Nt)						
non dialysé	0,675	—	—	5,9	—	—
dialysé	0,503	—	—	—	—	476

- (1) p. 100 des matières azotées totales du lait.
(2) mg de noir amido par g de protéines précipitées.
(3) Lait de mélange.

après les corrections nécessaires pour tenir compte de la dilution en cours de dialyse.

La fraction dialysable des substances azotées totales est du même ordre de grandeur pour le lait et pour le filtrat (expériences A et B).

L'expérience A montre que la dialyse élimine du filtrat une quantité de substances azotées voisine de celle qui ne précipite pas avec le colorant (respectivement 6,0 et 5,71). L'expérience B indique, d'autre part, que cette même quantité est également voisine de celle du N.P.N. (respectivement 4,88 et 4,85).

Toutefois, si ces trois quantités sont voisines, elles n'intéressent pas nécessairement les mêmes substances : on voit, par exemple (expérience A) qu'une partie des « protéines solubles » du filtrat dialysé, correspondant à 0,795 p. 100 des matières azotées totales du lait, ne précipite pas avec le noir amido. Ce résultat est en accord avec ceux du tableau IV, montrant que des composants de cette fraction protéique ne réagissent pas entièrement avec le colorant ; mais il signifie également qu'une partie des substances azotées dialysables doit fixer le colorant. D'après les valeurs obtenues avant et après dialyse du filtrat A, on peut calculer que cette partie représente 1,085 p. 100 des matières azotées totales :

$$6,0 - (5,71 - 0,795) = 1,085.$$

Donc, 18,2 p. 100 de la fraction dialysable $\frac{(1,085 \times 100)}{6,0}$ réagissent avec le noir amido. La figure 4 donne une interprétation schématique de cette observation.

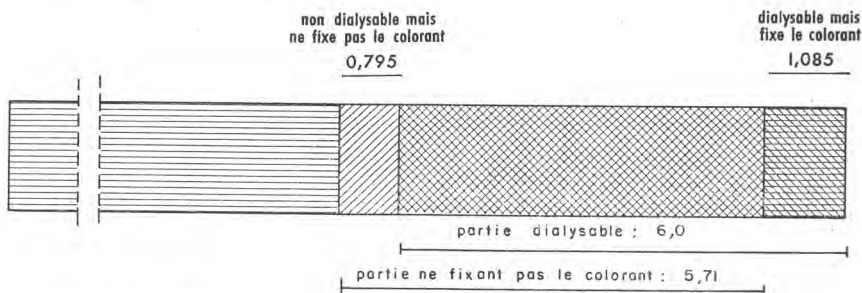


FIG. 4. — Représentation schématique de la fixation du noir amido par les matières azotées du filtrat (pH 4,6). (Les valeurs sont exprimées en p. 100 des matières azotées totales du lait.)

On peut arriver à la même conclusion en comparant les densités optiques obtenues après réaction avec le noir amido, avant et après dialyse. Les densités sont légèrement plus élevées après,

qu'avant la dialyse ; on peut donc penser qu'une substance capable de réagir avec le noir amido a été éliminée (acide aminé basique ou peptide ?) Toutefois il se peut également que l'élimination des sels (acétate, acide acétique) puisse expliquer cette différence.

Les protéines solubles fixent en moyenne, après dialyse, 478 mg de noir amido par gramme de protéine précipitée. Dans le filtrat brut, avant dialyse, la capacité de fixation est plus faible (460).

C. — *La caséine et le phosphocaséinate. Le lactosérum de coagulation par la présure.*

La caséine est la même que celle utilisée pour l'essai d'équivalence.

Le phosphocaséinate est obtenu à partir d'un lait de mélange écrémé * soumis à la supercentrifugation (1 h à 35 000 t/mn), dans une centrifugeuse « Sharples » refroidie. Le sédiment recueilli sur les parois du bol est lavé à deux reprises par l'eau distillée, en le remettant chaque fois en suspension dans un « mixer », puis en centrifugeant à nouveau dans les mêmes conditions.

Le lactosérum est obtenu après coagulation du même lait par la présure en 10 mn à 35° C et centrifugation 5 mn à 30 000 t/mn pour séparer le coagulum. Pour l'épreuve au noir amido on prend 3 ml de lactosérum (au lieu de 0,75 ml de lait).

Le lait ayant servi à préparer le phosphocaséinate et le lactosérum est analysé parallèlement. Dans la réaction au noir amido, les prises d'essais des quatre échantillons ont été choisies de manière à ce qu'elles contiennent toutes la même quantité d'azote total.

Le tableau VII présente les résultats.

TABLEAU VII
EXPÉRIENCES AVEC LE PHOSPHOCASÉINATE ET LE LACTOSÉRUM

	Matières azotées totales pour 100 g	Densité optique (3)	Matières azotées non-précipi- tées par le colorant (1)	Colorant fixé (2)
Lait de mélange	2,96	0,345	7,2	372
Phosphocaséinate	2,82	0,327	0,5	353
Sérum de coagulation (pré- sure)	0,783	0,377	33,3	468
Caséinate de soude	2,27	0,300	0,4	361

(1) p. 100 des matières azotées totales.

(2) mg de noir amido par g de protéines précipitées.

(3) quantité d'azote constante dans la prise d'essai : 3 484 mg.

* Ce lait n'est pas le même que celui qui a servi à préparer la caséine.

La caséine et le phosphocaséinate réagissent presque en totalité avec le colorant, pour fixer respectivement 361 et 353 mg de noir amido par gramme de protéine, valeurs proches l'une de l'autre, mais qui diffèrent sensiblement de celle trouvée par la méthode d'équivalence : 317 (tableau IV).

La capacité de fixation des protéines du lactosérum (« protéines solubles » plus « protéose de HAMMARSTEN,) pour le noir amido diffère peu (468 mg/g de protéine) de celles déterminées avec le filtrat isoélectrique (tableau VI, 450, 478 et 451 mg/g). La proportion des substances azotées totales du lactosérum ne réagissant pas avec le colorant est plus forte que celle obtenue avec les filtrats isoélectriques des expériences précédentes (tableau IV : 30,8 et d'après le tableau VI : 23,6). Il est probable que la différence est imputable, au moins en partie, à la fraction azotée détachée de la caséine par la présure et présente dans le sérum de coagulation.

D. — *Expérience avec des laits appauvris et enrichis en caséine.*

Etant donné l'écart constaté entre la capacité de fixation du colorant par la caséine d'une part et par les protéines solubles, d'autre part, nous avons cherché à déterminer, grâce à une technique un peu différente des précédentes, l'influence d'une variation des proportions relatives de caséine et de protéines solubles analogue à celle que l'on peut rencontrer, par exemple, dans le cas des laits de mammité.

Un lait de mélange est divisé en deux portions : l'une est appauvrie en caséine par élimination de phosphocaséinate au moyen de la supercentrifugeuse Sharples (de 15 mn à 1 h, à 35 000 t/mn), tandis qu'une autre portion est enrichie en caséine par addition de phosphocaséinate (provenant de l'opération précédente).

Deux séries d'expériences ont été faites et ont donné des résultats du même ordre. Le tableau VIII résume l'une d'entre elles au cours de laquelle on a soumis à l'action du noir amido une série de « laits » dans lesquels la proportion de caséine variait de 94,9 à 16,9 p. 100 des matières azotées totales. La partie non-caséine (p. 100 des matières azotées totales) variait donc en sens inverse ; mais, à l'intérieur de cette partie non-caséine, les proportions relatives des constituants solubles (N.P.N. d'une part, « protéines solubles » d'autre part) demeuraient inchangées.

L'expérience a donné lieu aux observations suivantes :

La quantité de colorant fixée par gramme de protéines précipitées est d'autant plus grande que la proportion de caséine est plus basse, confirmant ainsi que la caséine a une capacité de fixation inférieure à celle des « protéines solubles ».

TABLEAU VIII
EXPÉRIENCES AVEC DES PROPORTIONS VARIABLES DE CASÉINE

	Matières azotées totales pour 100 g	Densité optique (6)	Caséine (1)	Protéines solubles (1)	N.P.N. (1)	Matières azotées non-précipitées par le colorant (1)	Protéines précipitées par le colorant (4)	Colorant fixé (2)	Prise d'essai (6)	Matières azotées totales d'après la droite de régression (5)	Ecart (3)
Lait fortement enrichi en phosphocaséinate	6,52	0,296	94,9	3,9	1,2	2	99,2	373	0,350	2,58	— 0,03
Lait enrichi	6,09	0,270	87,9	9,3	2,8	2,8	99,9	393	0,367	6,34	+ 0,25
Lait normal (de mélange).	2,99	0,299	76,6	18,0	5,4	6,2	99,1	387	0,750	2,99	0,00
Lait appauvri	1,11	0,325	37,4	48,2	14,4	16,1	98,1	439	2,046	1,05	— 0,06
Lait fortement appauvri .	0,85	0,250	16,9	67,9	19,2	20,1	98,8	489	2,672	0,91	+ 0,06

- (1) p. 100 des matières azotées totales.
 (2) mg de noir amido par g de protéines précipitées.
 (3) Ecart entre les matières azotées d'après la droite de régression et les matières azotées Kjeldahl.
 (4) p. 100 des protéines totales.
 (5) Lecture corrigée par $\times \frac{p}{0,75}$.
 (6) La prise d'essai p (en g) contient toujours la même quantité d'azote (3,572 mg).

La proportion de matières azotées non-précipitées par le colorant est en moyenne un peu supérieure à celle du N.P.N. et cette différence semble plus marquée lorsque la teneur du « lait » en « protéines solubles » est plus forte. Ce résultat s'accorde avec ceux obtenus précédemment ; une grande partie du N.P.N. ne fixe pas le colorant, ainsi qu'une petite partie des « protéines solubles ».

Les données du tableau VIII permettent d'établir des équations à deux inconnues de la forme :

$$a \times C + b \times NC = p \times P$$

dans lesquelles C : caséine,

NC : non-caséine précipitée,

P : protéines totales précipitées ;

a , b et p représentent les capacités de fixations respectives de chacune de ces fractions pour le noir amido ; p est seul donné par l'expérience.

On obtient cinq équations qui, résolues deux à deux, donnent 10 résultats pour a et 10 pour b ; les valeurs moyennes sont :

$$\text{caséine : } a = 360$$

$$\text{non-caséine : } b = 495.$$

La capacité de fixation de la caséine est très proche de celle (361) trouvée dans l'expérience précédente ; la capacité de fixation des protéines solubles est, par contre, un peu plus élevée, respectivement 495 et 468.

Avec la densité optique, nous avons cherché à connaître la teneur en matières azotées totales d'après la droite de régression établie au laboratoire, correspondant à l'équation :

$$P = 4,632 - 5,5 d$$

La teneur en matières azotées p. 100 du produit est corrigée par le facteur $\frac{0,75}{p}$ étant donné que la droite de régression a été établie pour des prises d'essai de 0,75 g de lait, alors que, dans cette expérience, on a choisi des prises d'essai (p) différentes, afin d'avoir la même teneur en azote dans chaque prélèvement. Les résultats du tableau VIII montrent que les écarts avec le dosage par Kjeldahl, en valeur absolue, sont peu importants, bien qu'il s'agisse de « laits » présentant des différences considérables de composition en fractions azotées ayant des capacités de fixation du colorant très différentes.

TABLEAU IX

EXPÉRIENCES AVEC LES LAITS CRU ET CHAUFFÉ

Lait (de mélange)	Densité optique	Matières azotées précipitées à pH 4,6 (1)	Protéines solubles (1)	N.P.N. (1)	Matières azotées non-précipitées par le colorant (1)	Protéines précipitées par le colorant (2)	Colorant fixé (3)
Cru	0,247	78,2	16,6	5,2	5,9	99,2	380
Pasteurisé	0,249	78,5	16,2	5,3	6,4	98,8	379
Bouilli	0,257	90,8	4,7	5,5	6,8	98,7	376
Stérilisé	0,267	88,9	5,1	6,5	7,1	99,2	371

(1) p. 100 des matières azotées totales. (La matière azotée dosée par micro-Kjeldahl est : $N \times 6,38 = 3,36$ p. 100 pour tous ces laits.)

(2) p. 100 de protéines totales.

(3) mg de noir amido par g de protéines précipitées.

VI. — Etude des laits chauffés

Un même lait de mélange (de vache) a été chauffé dans les conditions suivantes :

- 63° C pendant 30 mn (pasteurisation basse) ;
- 100° C (bain-marie bouillant) pendant 10 mn ;
- 115° C pendant 20 mn (stérilisation à l'autoclave).

Le volume final est maintenu égal au volume initial. Le tableau IX résume les résultats.

Pour une même prise d'essai réagissant avec le noir amido, les densités optiques sont plus élevées pour les laits chauffés ; on trouverait donc, en pratique, pour les laits chauffés, une teneur « apparente » en protéines inférieure à celle déterminée par le Kjeldahl.

VII. — Etude des laits de mammites*

On a étudié la réaction du noir amido et la répartition des fractions azotées dans trois échantillons de lait présentant des infections microbiennes plus ou moins sévères :

Deux de ces échantillons ont été prélevés sur la vache 30 H (troupeau du Centre National de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas), atteinte de mammites subclinique (tableau X) :

a) Mélange du lait des quartiers postérieurs, les plus légèrement infectés au moment où le prélèvement a été fait ;

b) Lait du quartier antérieur gauche, le plus gravement infecté.

Le troisième échantillon (c), représente le mélange du lait provenant de trois vaches (ferme du Breuil (Seine-et-Marne)) dont l'examen cyto-bactériologique donne pour tous les quartiers prélevés le résultat suivant :

- +++ staphylocoques, α β hémolytiques,
- +++ à l'épreuve C.M.T.

La composition azotée de ces trois échantillons (a, b, c) est donnée dans le tableau XI ; comme il est classique en pareil cas, la proportion de caséine diminue et les proportions des protéines solubles et du N.P.N. augmentent dans les laits les plus sévèrement infectés.

L'échantillon « a », le moins anormal au point de vue cyto-bactériologique, a une composition normale en ce qui concerne la répartition des constituants azotés. On peut le prendre comme terme de comparaison.

* Nous remercions le Dr Plommet, de la Station Centrale de Recherches laitières, qui a fait l'examen cyto-bactériologique de ces laits.

TABLEAU X

ÉTAT SANITAIRE DE LA VACHE 30 H

	QUARTIERS			
	Antérieur		Postérieur	
	Droit	Gauche	Droit	Gauche
26.2.59. Traitement	Auréomycine	Chloramphénicol	Auréomycine	Chloramphénicol
9.3.59. Examen bactériologique (1) .	+ Staph. $\alpha \beta$	+ Staph. $\alpha \beta$	—	++ Staph. $\alpha \beta$
C.M.T. (2)	+++	+++	++	+++
20.3.59. Examen bactériologique (1) .	+ Staph. $\alpha \beta$	+ Staph. $\alpha \beta$	—	++ Staph. $\alpha \beta$
C.M.T. (2)	++	+++	—	—
23.3.59. Examen bactériologique (1) .	+ Staph. $\alpha \beta$	++ Staph. $\alpha \beta$	—	++ Staph. $\alpha \beta$
C.M.T. (2)	+	+	—	—
24.3.59. Prélèvement pour l'analyse .		+	+	+

(1) Staph $\alpha \beta$: staphylocoque $\alpha \beta$ hémolytique.

(2) California Mastitis test.

TABLEAU XI
EXPÉRIENCES AVEC LES LAITS DE MAMMITE

	Densité optique	Caséine (1)	Protéines solubles (1)	N.P.N. (1)	Matières azotées non-précipitées par le colorant (1)	Protéines précipitées par le colorant (2)	Colorant fixé (3)
Lait a	0,235	78,4	17	4,6	4,8	99,8	367
Lait b	0,266	74,9	19,7	5,4	6,75	98,6	374
Lait c	0,331	73,1	20,5	6,4	7,9	98,4	347

(1) p. 100 des matières azotées totales.

(2) p. 100 des protéines totales.

(3) mg de noir amido par g de protéines précipitées.

TABLEAU XII
EXPÉRIENCES AVEC LES LAITS DE MÉLANGE DE CHÈVRE ET DE BREBIS

	Matières azotées totales pour 100 g	Densité optique (prise d'essai, ml)	Caséine (1)	Albumine + globuline (1) (2)	Protéose peptone (1) (2)	N.P.N. (1)	Matières azotées non précipitées par le colorant (1)	Protéines précipitées par le colorant (3)	Colorant fixé (4)
<i>Lait de chèvre :</i>									
N° 1	2,62	0,43 (0,75)	74	15	2,42	8,58	8,74	99,8	365
N° 2	2,68	0,41 (0,75)					7,80	—	361
<i>Lait de brebis :</i>									
N° 1	6,19	0,285 (0,40)	78,6			4,62	7	97,5	365
N° 2	6,35	0,276 (0,40)	78,9	15,4	1	4,66	5,26	99,4	363
N° 3	6,32	0,345 (0,35)					4,30	—	361
N° 4	6,15	0,350 (0,35)	80,5				6,07	—	357

(1) p. 100 des matières azotées totales.

(2) Selon *Aschaffenburg et Drewry* [12].

(3) p. 100 des protéines totales.

(4) mg de noir amido par g de protéines précipitées.

Le tableau XI montre également que l'écart entre azote non protéique (N.P.N.) et azote des substances non précipitées par le noir amido va en augmentant de l'échantillon *a* à l'échantillon *c*. La proportion des protéines totales du lait précipitant avec le colorant, diminue dans les laits de mammite caractérisée : échantillons « *b* et *c* » et ceci va de pair avec leur teneur plus faible en caséine.

La quantité de colorant fixée par gramme de protéines précipitées présente la valeur minimum dans le lait de mammite grave (dans l'application pratique de la méthode au noir amido ce lait aurait une teneur en matières azotées inférieure à celle que donnerait la méthode Kjeldahl). Ce lait contient plus de protéines solubles que les laits normaux. Précédemment on a établi que les protéines solubles des laits normaux avaient une capacité de fixation du colorant, supérieure à celle de la caséine. Ce résultat indiquerait, au contraire, que le lait de mammite grave, contiendrait une fraction protéique à faible capacité de fixation du colorant. Il serait nécessaire d'avoir d'autres résultats pour confirmer ou infirmer cette observation.

Récemment, VANDERZANT et TENNISON [15] ont signalé que les laits de mammites donnent des résultats erronés avec le noir amido.

VIII. — Laits de chèvre et laits de brebis

A. — *Laits de mélange.*

Le tableau XII présente les résultats obtenus avec deux laits de chèvre et quatre laits de brebis.

La répartition des substances azotées dans le lait de mélange de chèvre est sensiblement différente de celle que l'on rencontre habituellement dans le lait de vache, le taux de caséine est faible, celui du N.P.N. et de la protéose-peptone est élevé.

La fixation du noir amido sur les matières azotées précipitées se fait, en moyenne, dans des proportions un peu plus faibles que celles obtenues pour le lait de vache (voir plus haut) :

Lait de chèvre : 363 mg de noir amido/g protéine,

Lait de brebis : 362 mg de noir amido/g protéine,

Lait de vache : 377 mg de noir amido/g protéine.

Dans le lait de chèvre, de même que dans le lait de vache, la proportion des substances azotées ne réagissant pas avec le colorant est légèrement supérieure à la proportion de N.P.N., cette dernière valeur étant d'ailleurs relativement élevée pour le lait de chèvre. Dans les laits de brebis, la même différence existe, encore plus prononcée (lait n° 1) ; donc une partie plus importante des « protéines solubles » ne réagit pas avec le noir amido.

TABLEAU XIII
LAITS INDIVIDUELS DE BREBIS

Brebis n°	Densité optique (1)	Matières azotées p. 1 000 de lait (Kjeldahl)
7.316	0,175	78,9
7.352	0,335	61,1
7.796	0,234	69,6
7.839	0,362	55,5
VE.719	0,292	63,2
7.783	0,238	66,3
7.773	0,145	77
7.767	0,165	76,6
7.727	0,225	68
7.725	0,320	60,1
7.723	0,232	68,7
7.100	0,186	73,3
6.045	0,147	79,6
VE.744	0,315	61,7
VE.724	0,324	58,1

(1) Prise d'essai 0,4 ml.

B. — Lait*s* individuels de brebis.

Le lait de 15 brebis (troupeau du C.N.R.Z., Jouy-en-Josas) en pleine lactation, a été analysé ; pour la réaction avec le noir amido, la prise d'essai est de 0,4 ml.

Le tableau XIII présente les résultats. On a calculé d'autre part :

— coefficient de corrélation r : — 0,98 ;

— équation de la droite de régression : $P = 93,6 - 1,047 d$,
ou d : densité optique,

P : matières azotées, g pour 1 000 g.

Bien que ces résultats portent sur 15 échantillons seulement, nous les donnons ici, à titre indicatif, car ils ont été confirmés par d'autres, beaucoup plus nombreux, obtenus également par la méthode du noir amido, mais suivant une technique légèrement différente de celle exposée ici et qui sera publiée ailleurs.

C. — Phosphocasin*ate*, lactosérum de coagulation par la présure du lait de brebis.

Cette expérience a été exécutée dans les mêmes conditions et au même moment que celle décrite plus haut, pour le lait de vache (tableau VII).

TABLEAU XIV
 EXPÉRIENCES AVEC LE PHOSPHOCASÉINATE
 ET LACTOSÉRUM DE BREBIS :

	Matières azotées totales pour 100 g	Densité optique (1)	Matières azotées non- précipitées par le colorant (2)	Colorant fixé (3)
Lait de mélange . .	6,32	0,345	4,3	361
Phosphocaséinate .	4,12	0,358	0,0	332
Sérum de coagulation (présure) . . .	1,68	0,350	29,6	471

(1) prise d'essai contenant 3,484 mg N dans chaque cas.

(2) p. 100 des matières azotées totales.

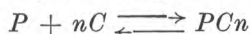
(3) mg de noir amido par g de protéines précipitées.

Le tableau XIV montre que le phosphocaséinate de brebis fixe moins de colorant que celui de vache (332 au lieu de 353); 100 p. 100 de la substance réagit avec le noir amido.

Les substances azotées du lactosérum de brebis fixent une quantité de colorant très voisine de celle du lactosérum de vache (471 au lieu de 468) : 29,6 p. 100 de ces substances ne réagissent pas avec le noir amido (33,3 p. 100 dans le cas du lait de vache).

DISCUSSION

En ce qui concerne le mécanisme de la réaction du noir amido sur les protéines, la détermination du point d'équivalence et l'étude des particularités des courbes (fig. 2 et 3) montrent qu'il n'y a pas une réaction réversible unique du type :



P étant une particule protéique et nC le nombre d'équivalents de noir amido.

Il est probable que la réaction se passe progressivement avec formation successive des composés colorés : PC_1 , PC_2 , PC_3 ;... PC_n ; les premiers sont solubles, mais à partir du moment où ils fixent un certain nombre de molécules de colorant PC_x , ils deviennent insolubles dans le milieu réactionnel et précipitent. La figure 3

montre que la quantité de protéines précipitées s'accroît régulièrement au fur et à mesure que la quantité de colorant ajoutée s'élève. Dès le commencement de la réaction, alors que la quantité de colorant présente est très faible par rapport à la quantité de protéines, il y a formation d'un précipité. Toutes les particules protéiques n'entrent donc pas en réaction avec le colorant de manière uniforme.

D'après SCHOBER et HETZEL [1], la réaction du colorant sur les protéines n'est complète qu'avec un excès de colorant, ce qui sous-entend que la réaction est réversible. D'après nos expériences, il semble plutôt s'agir d'une réaction progressive.

Dans les conditions de l'épreuve, les différentes fractions azotées constituant les protides du lait réagissent en proportions variables avec le noir amido et chacune de ces fractions fixe une quantité de colorant déterminée par gramme de protéine. Pour le lait de vache normal, on peut admettre les valeurs moyennes indiquées dans le tableau XV.

TABLEAU XV

CAPACITÉ DE FIXATION DU NOIR AMIDO PAR LES PROTÉINES DU LAIT DE VACHE
(mg de colorant par g de protéines précipitées)

	Noir amido			Orangé G (1) millimoles (P.M. = 452)
	brut (85 p. 100) mg	pur $C_{22}H_{14}O_9N_6$ S_2Na_2 mg	millimoles (P.M. = 616,5)	
Caséine	360	306	0,50	0,42
Protéines solubles .	480	408	0,66	0,54
Protéines totales . .	380	323	0,52	0,45

(1) Calculées d'après *Ashworth* et *Seals* (11).

Dans le cas du lait chauffé, la capacité de fixation du colorant par les protéines totales du lait diminue légèrement et c'est peut-être aussi le cas de certains laits de mammite.

Les capacités de fixation du colorant par les protéines totales et par la caséine du lait de brebis sont un peu inférieures à celles du lait de vache.

Le tableau XV permet une comparaison entre nos résultats et ceux d'ASHWORTH et SEALS avec l'orangé G [11] (transformés

TABLEAU XVI
FIXATION DU NOIR AMIDO PAR LA CASÉINE

	Caséine		mg noir amido par g de caséine
	Composition p. 100	Millimoles d'amino-acides par g de caséine	
Lysine	8,2	0,562	173
Arginine	4,1	0,235	72,4
Histidine	3,1	0,199	61,6
Totalité de la protéine ..			307

en millimoles). Ces derniers sont inférieurs de 15 p. 100 environ aux valeurs obtenues avec le noir amido.

Ce sont les groupements basiques libres et dissociés qui interviennent dans la réaction de la protéine avec le noir amido ; les trois acides aminés basiques contenus dans la caséine se combinent chacun avec un équivalent (une demi-molécule) de noir amido. D'après la composition de la caséine on peut évaluer la quantité de colorant que peut, théoriquement, fixer la protéine. Le tableau XVI donne les résultats de ce calcul. La composition de la caséine est celle donnée par TRISTRAM [13]. La valeur obtenue par calcul (307), est très voisine de celle déterminée expérimentalement (306, tableau XV).

Alors que la caséine réagit avec le colorant dans la proportion de 100 p. 100, les protéines solubles laissent toujours un peu de substance azotée dans le surnageant ; c'est principalement la partie protéose-peptone qui est responsable de cette réaction incomplète. On a vu, à plusieurs reprises, que la proportion de substances azotées ne réagissant pas avec le noir amido était légèrement supérieure à la proportion des substances azotées non-protéiques (N.P.N.). On pouvait penser que la fraction N.P.N. ne réagit pas avec le colorant, c'est d'ailleurs ce qu'ont écrit ASHWORTH et SEALS [11]. Cependant, l'expérience effectuée sur le filtrat iso-électrique (pH 4,6) avant et après dialyse, montre qu'une partie de la fraction dialysable, constituée essentiellement par le N.P.N., doit fixer le colorant.

Une question importante est de savoir si des différences dans le comportement des fractions azotées du lait vis-à-vis de la solution de noir amido ont une influence sur le résultat du dosage colorimétrique lorsque les proportions relatives de ces fractions varient.

L'expérience avec les laits enrichis et appauvris en caséine permet de penser qu'il n'y a pas d'erreur importante lorsque la teneur en N.P.N. varie comme celle des protéines solubles, si bien qu'il n'y a, en fait, que deux variables dans un système à trois types de composants :

— La caséine qui fixe 360 mg de colorant par gramme et réagit à 100 p. 100 avec le colorant (aux erreurs d'expérience près) ;

— Les « protéines solubles » qui fixent 480 mg de colorant par gramme et réagissent en moyenne dans la proportion de 96 p. 100 avec le colorant ;

— Le N.P.N. qui ne fixe pas — ou fixe peu — le colorant.

Il peut donc se produire une compensation entre la caséine d'une part, et les deux autres fractions azotées (« protéines solubles » et N.P.N.) d'autre part.

Les variations (naturelles) de la teneur en N.P.N. des laits, sont peu connues. On peut admettre qu'elles sont parallèles à celles de la teneur en protéines solubles, en considérant les nombreuses données dont on dispose maintenant et qui indiquent une excellente corrélation entre la méthode colorimétrique et le dosage Kjeldahl [17] [18].

NOTE AJOUTÉE EN COURS D'IMPRESSION

Le travail de R. M. DOLBY (*J. Dairy Res.*, 28, 43, 1961), vient d'être porté à notre connaissance.

La conclusion de cet auteur rejoint parfaitement la nôtre : la capacité de fixation globale du lactosérum (protéines solubles + N.P.N.) est à peu près la même que celle de la caséine. De sorte qu'une variation dans les proportions relatives de ces deux constituants n'altère pas la corrélation existant entre le résultat du dosage des matières azotées du lait par la méthode Kjeldahl et le résultat obtenu par la méthode de fixation du colorant.

RÉSUMÉ

On a étudié la réaction des différentes fractions protéiques du lait avec le noir amido afin de connaître l'influence que pourraient avoir sur la méthode de dosage rapide, des variations dans la composition de la partie azotée du lait.

La pureté du noir amido a été étudiée. Des différences ont été observées entre certains lots de provenances diverses.

La capacité de fixation du colorant par les protéines du lait a été déterminée grâce à plusieurs techniques analytiques. La caséine fixe moins de colorant que les protéines solubles (respectivement 360 et 480 mg de colorant brut par gramme de protéine en moyenne). La capacité de fixation trouvée pour la caséine correspond bien à sa composition en acides aminés basiques. Dans les matières azotées totales du lait, la partie qui ne réagit pas avec le colorant correspond approximativement à la proportion de N.P.N.; cependant une petite partie des protéines solubles ne fixe pas non plus de colorant.

La caséine précipite totalement avec le noir amido; les protéines solubles précipitent seulement dans la proportion de 96 p. 100 en moyenne. Le cours de la réaction a été étudié par la méthode « d'équivalence ».

Le chauffage diminue la capacité de fixation du colorant par les protéines du lait. Avec un lait de mammitte on a observé également une diminution par rapport au lait normal. De tels laits donneraient avec la méthode au noir amido, des résultats un peu inférieurs à ceux de la méthode Kjeldahl.

La méthode a été appliquée aux laits de chèvre et de brebis qui ont une capacité de fixation un peu moindre que celle du lait de vache.

Lorsque la teneur en caséine varie il se produit une compensation avec les protéines solubles qui fixent fortement, mais ne réagissent pas complètement avec le noir amido et la fraction N.P.N. qui ne fixe pas, ou peu, de colorant.

SUMMARY

THE REACTION OF AMIDO BLACK WITH VARIOUS FRACTIONS OF MILK PROTEINS

The reaction of amido black with various fractions of milk proteins has been studied in order to know whether variations in the nitrogen distribution of milk could influence the test.

The purity of the dye has been examined: differences in composition have been observed between samples of different origin.

The quantity of dye which can be adsorbed by milk proteins has been determined by means of several analytical techniques. Casein adsorbs less dye than soluble proteins (360 and 480 mg/g protein respectively, on the average). For casein, the adsorption corresponds to the basic amino acid content of the protein.

In the total nitrogenous matter of milk, the part which does not react with the dye corresponds approximately to the N.P.N. content.

Casein completely precipitates with amido black and, on an average, 96 p. 100 of the soluble proteins are precipitated. The course of the reaction has been studied by the « equivalence » method.

The capacity for dye adsorption by proteins in heated milk is decreased. A similar decrease has been observed with one sample of mastitis milk as compared to normal milk. Using the amido black method, the protein content of such milks would be slightly inferior to that obtained with the Kjeldahl method.

The method has been applied to goat's and sheep's milk, which have a slightly inferior capacity to adsorb the dye than cow's milk. The soluble proteins, which strongly adsorb but do not react completely with amido black, and the N.P.N. fraction which may adsorb at the most only a slight amount of the dye, compensate for a variation in the casein content.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] R. SCHOBER et H. F. HETZEL, *Milchwiss.*, **11**, 123. 1956.
- [2] K. STEINSHOLT, *Meieriposten*, **46**, 259, 279. 1957.
- [3] K. STEINSHOLT. *Meieriposten*, **46**, 901. 1957.
- [4] G. HADLAND et O. JOHNSEN. *Meieriposten*, **48**, 433, 451. 1959.
- [5] C. W. RAADSVELD. *Off. Org. K. ned. Zuivelb.*, **49**, 823. 1957.
- [6] C. W. RAADSVELD. *Off. Org. K. ned. Zuivelb.*, **50**, 146. 1958.
- [7] C. W. RAADSVELD. *XV^e Congrès International de Laiterie*, Londres, **3**, 1638. 1959.
- [8] S. POSTHUMUS. *Landbouvoorlichting*, **69**, **16**. 1959.
- [9] D. C. UDY, *Nature*, **178**, 314. 1956.
- [10] H. FRAENKEL-CONRAT et M. COOPER. *J. Biol. Chem.*, **154**, 239. 1944.
- [11] U. S. ASHWORTH et R. SEALS. *Proceed. 38th Ann. meeting of Western Division american. Dairy Sci. Assoc.*, 1957. *J. Dairy Sci.*, **41**, 227. 1958.
- [12] R. ASCHAFFENBURG et J. DREWRY. *XV^e Congrès International de Laiterie*, Londres, vol. **3**, 1631. 1959.

- [13] G. R. TRISTRAM. In *The Proteins*, New-York, vol. 1, part A, 216. 1953.
[14] S. J. ROWLAND et M. ZEIN-EL-DINE. *J. Dairy Sci.*, 10, 266. 1939.
[15] C. VANDERZANT et W. R. TENNISON. Abst. paper 55th ann. Meet. *Am. Dairy Sci. Assoc.*, 1960, in *J. Dairy Sci.*, 43, 854. 1960.
[16] K. SHIGA, R. SHIMIZU et H. HAMA. *Bull. Nat. Inst. Agric. Sci. (Japan)*, série G, n° 18, 1. 1959.
[17] J. M. TREECE, L. O. GILMORE et N. S. FISCHMEISTER. *J. Dairy Sci.*, 727, 41. 1958.
[18] J. M. TREECE, L. O. GILMORE et N. S. FISCHMEISTER. *J. Dairy Sci.*, 42, 367. 1959.

COMMENT CONCEVOIR UNE SURVEILLANCE DES POLLUTIONS RADIOACTIVES DU LAIT

par

G. MICHON

Service d'Hygiène atomique
et de Radiopathologie
C. E. A.

Le lait, aliment essentiel, fait l'objet d'une surveillance et de contrôles vigilants régis par de nombreux textes législatifs qui protègent ses qualités marchandes et sanitaires.

Le développement de l'utilisation de l'énergie nucléaire pose et posera de nouveaux problèmes d'hygiène et le lait doit bénéficier de contrôles portant sur sa pollution radioactive éventuelle.

Les animaux herbivores sont particulièrement exposés aux contaminations radioactives et les laits qu'ils produisent, du fait de leurs compositions salines et du métabolisme particulier de la glande mammaire, n'échappent point aux pollutions. De ce fait, le lait est un intégrateur de contamination et son analyse permet de retrouver des radioéléments que l'on ne décèle qu'avec beaucoup de difficultés sur un échantillon végétal de taille moyenne.

I. — ORGANISATION DES PRÉLÈVEMENTS

Le but de la surveillance du lait consiste à déterminer quelle est la contribution de cet aliment à la contamination de l'homme. Cette participation est importante pour les radioéléments de la famille des alcalino-terreux, car le lait reste tout au long de notre vie, dans les pays européens, le vecteur essentiel du calcium alimentaire.